苜草素对蛋鸡胆固醇代谢的影响及其基因调控机制

李 宁 刘 鑫 曲正祥 刘 通 杜 宇 闵育娜* 高玉鹏*

(西北农林科技大学动物科技学院，杨凌 712100)

摘 要：本试验旨在研究饲粮中添加不同水平苜草素对蛋鸡胆固醇代谢的影响，并探讨其基因表达调控机制。选取体重和产蛋率相近的 26 周龄尼克蛋鸡 540 只，随机分为 5 组，每组 6 个重复，每个重复 18 只。对照组饲喂基础饲粮，试验组分别在基础饲粮中添加 300、600、900、1 200 mg/kg 的苜草素。预试期 7 d，正试期 70 d。结果表明：1）试验第 35 天和第 70 天，900 mg/kg 苜草素组的蛋黄胆固醇含量显著低于对照组（*P*＜0.05）。2）与对照组相比，900 mg/kg 苜草素组显著升高了蛋鸡血清中高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）含量和高密度脂蛋白/低密度脂蛋白（HDL/LDL）（*P*＜0.05），各组蛋鸡血清中总胆固醇（TC）、甘油三酯（TG）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）含量差异均不显著（*P*＞0.05）。3)与对照组相比，600、900、1 200 mg/kg 苜草素组显著降低了蛋鸡肝脏中 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶（*HMGCR*）mRNA 表达量（*P*＜0.05），900 和 1 200 mg/kg 苜草素组显著升高了蛋鸡肝脏组织中胆固醇 7α-羟化酶（*CYP7A1*）mRNA 表达量（*P*＜0.05）。各组蛋鸡肝脏中固醇结合蛋白元件-2（*SERBP*-2）和卵巢中卵黄蛋白原受体（*OVR*）mRNA 表达量无显著差异（*P*＞0.05）。综上，饲粮中添加苜草素降低了蛋黄胆固醇和全蛋胆固醇含量，其调控机制可能是通过抑制蛋鸡胆固醇的内源性合成和促进胆固醇向胆汁酸的转化排泄 2 种途径来实现。本试验推荐 26～35 周龄蛋鸡苜草素添加水平为 900 mg/kg。

关键词：苜草素；饲养；蛋鸡；胆固醇代谢；基因表达

中图分类号: S831　　文献标识码:　　文章编号：

收稿日期：2015-11-19

基金项目：现代农业产业技术体系（CARS-41-K13）；科技部农业科技成果转化项目（2013GB2G000468）

作者简介：李 宁（1990--），女，陕西汉中人，硕士研究生，研究方向为动物营养与饲料科学。E-mail：810226606@qq.com

*通信作者：闵育娜，副教授，硕士生导师，E-mail： 472956784@qq.com；高玉鹏，教授，博士生导师，E-mail： gaoyupeng112@sina.com

鸡蛋营养成分全面且均衡，是人们重要的动物性食品之一，但鸡蛋的消费量因其较高的胆固醇含量而受到制约[1-3]。研究表明，通过调节膳食中的胆固醇含量可以降低血液中胆固醇含量[4-5]，且这一理念普遍深入人心。虽然美国膳食指南在 2015 年对胆固醇的摄入量已不加限制[6]，但并非全部专家给予认同和赞同[7-9]，胆固醇仍是心血管健康的潜在威胁之一[10]，尤其对于那些有动脉粥状硬化、糖尿病、高胆固醇血症的人[11-12]，更应加以注意。随着人们对健康的重视和对高胆固醇危害意识的增强，低胆固醇鸡蛋越来越受到大众的青睐[13]。因此，寻求新途径研发低胆固醇鸡蛋对生产保健蛋品及发展蛋鸡产业具有重要的现实意义。选择利用植物源性添加剂来降低鸡蛋胆固醇可能是绿色、安全、理想的途径之一。苜草素（polysavone）是从紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)中通过现代破壁萃取工艺技术提取的纯植物饲料添加剂，具有用量少、功效明显、稳定性好的特点，其主要功能活性成分为多糖、黄酮、皂甙等[14]。研究表明，皂甙、黄酮和多糖具有促进畜禽生长、增强机体免疫力、降血脂、提高机体抗氧化等作用[15-17]，且能减少畜牧业对抗生素的依赖。Dong 等[18]研究表明，饲粮中添加 500～1 000 mg/kg 苜草素能够提高肉鸡的抗氧化活性，改善肉品质。王长康等[19]在蛋鸡上的研究表明，苜草素能提高蛋鸡生产性能与蛋品质，对降低血清胆固醇含量也有作用。张丽娜等[20]表明，蛋鸡饲粮中添加苜草素能够显著降低全蛋及肝脏中胆固醇含量，以 500～1 000 mg/kg 较优。综上所述，研究一般多限于对生产性能或直观代谢指标的表述，缺乏相关更深层次的动物代谢较为明晰的机制佐证，本研究以蛋鸡为例，探讨苜草素对其胆固醇代谢及相关基因表达的影响，探讨苜草素对蛋鸡鸡蛋胆固醇和血脂代谢影响的效用，并分析该效用与蛋鸡肝脏组织中调控胆固醇代谢的关键基因 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶（*HMGCR*）、固醇结合蛋白元件-2（*SERBP*-2）、胆固醇 7α-羟化酶（*CYP7A1*）和卵巢组织中卵黄蛋白原受体（*OVR*）mRNA 表达的关系，阐明苜草素对蛋鸡胆固醇代谢的作用机制，进而为确定苜草素在蛋鸡饲粮中的合理应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用苜草素为棕黄色粉末，由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所提供。苜草素提取方法为破壁萃取[14]，主要有效成分包括：多糖≥15%，总黄酮≥5%，总皂甙≥5%。

1.2　试验设计及饲粮

选取 540 只健康、产蛋性能基本一致的 26 周龄尼克蛋鸡。采用单因子完全随机设计，试验鸡随机分成 5 个组，每组 6 个重复，每个重复 18 只。对照组饲喂基础饲粮，试验组在基础饲粮中分别添加 300、600、900、1 200 mg/kg 的苜草素，试验期 77 d，其中预试期 7 d，正试期 70 d。

试验基础饲粮为玉米-豆粕型，参照我国《鸡饲养标准》（NY /T 33-2004）产蛋鸡营养需要配制，基础饲粮组成及营养水平见表 1。

表 1　基础饲粮组成及营养水平(风干基础)

Table 1　Composition and nutrient levels of the basal diet　（air-dry basis）　%

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米 Corn	59.00
豆粕 Soybean meal	22.00
菜粕 Rapeseed meal	2.60
棉粕 Cottonseed meal	2.00
豆油 Soybean oil	2.20
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	1.60
石粉 Limestone	8.20
食盐 NaCl	0.30
DL-蛋氨酸 *DL*-Methionine	0.10
预混料 Premix[1)]	2.00
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels[2)]	
代谢能 ME/（MJ/kg）	11.34
粗蛋白质 CP	16.49
赖氨酸 Lys	0.79
蛋氨酸 Met	0.36
苏氨酸 Thr	0.61
钙 Ca	3.45
总磷 TP	0.61
有效磷 AP	0.41

[1)] 预混料为每千克饲粮提供 The premix provided the following per kg of the diet：VA 10 000 IU，VD_3 1 800 IU，VE 10 IU，VK 10 mg，VB_{12} 5 ug，硫胺素 thiamine l mg，核黄素 riboflavin 4.5 mg，泛酸钙 calcium pantothenate 50 mg，烟酸 niacin 24.5 mg，吡哆醇 pyridoxine 5 mg，

生物素 biotin 1 mg，叶酸 folic acid 1mg，胆碱 choline 500 mg，Mn 65 mg，I 0.4 mg，Fe 60 mg，Cu 8 mg，Zn 80 mg，Se 0.3 mg。

2) 粗蛋白质、钙和总磷为实测值，其余为计算值。CP, Ca and TP were measured values, while the others were calculated values.

1.3 饲养管理

试验鸡只采用 3 层阶梯式笼养，密闭式鸡舍，自控式湿帘降温通风系统，组均匀分布于鸡舍不同空间，自由采食、饮水，每天光照 16 h。每天饲喂 2 次（08:30，14:30），15:00 准时收集鸡蛋。每天观察鸡群健康状况，记录死淘鸡数，常规免疫、消毒和饲养管理。

1.4 样品采集与处理

正试期第 35 天和第 70 天，每个重复随机取 3 枚鸡蛋分离蛋黄，称重后装于 10 mL 离心管，于 4 ℃冰箱保存。试验结束时，鸡称重求得每重复平均体重，每个重复选取与重复内平均体重差异不显著（P>0.05）的蛋鸡 3 只，空腹 12 h 后于左翅下采血 5 mL 于促凝管中，室温静置 1 h 后 3 500 r/min 离心 15 min 制成血清，分装于 EP 管中，-20 ℃保存备用。采血后鸡只屠宰分别取同部位的肝脏组织和卵泡组织各 2 g 左右放入冻存管快速置于液氮中速冻，-80 ℃保存待测。

1.5 测定指标与方法

1.5.1 鸡蛋胆固醇提取与检测

蛋黄处理方法参照文献[21]，胆固醇提取后用 0.45 μm 有机微孔滤膜过滤，色谱柱测定。鸡蛋胆固醇含量用蛋黄胆固醇含量（mg/g）和全蛋胆固醇含量（mg/枚）2 个指标表示[22]。

1.5.2 血清生化指标

血清中总胆固醇（TC）、甘油三酯（TG）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）的含量按照试剂盒说明书于采样后 48 h 内采用全波长酶标仪（美国 Bio-Tek 公司）进行测定，试剂盒购自北京北化康泰临床试剂有限公司。

1.5.3 胆固醇代谢相关基因的表达量的测定

取肝脏组织 30 mg，卵巢组织 50 mg，按照试剂盒（北京天恩泽有限公司）说明书提取总 RNA，用紫外分光光度计（日本 Hitachi 公司）测定总 RNA 浓度及纯度，所有样品吸光

度比值（OD260nm/OD280nm）在 1.8～2.0，1%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。用反转录试剂盒（大连宝生物工程有限公司）将所有 RNA 样品进行反转录，反应采用 10 μL 体系，转录方法参照试剂盒说明书。获得的 cDNA 稀释 10 倍，-20 ℃保存备用。

根据 GenBank 上原鸡的 cDNA 序列，用 Primer 5.0 软件设计引物，将 β-肌动蛋白（β-actin）设为内参基因。引物由上海英俊生物技术有限公司合成，引物详细资料见表 2。肝脏 *HMGCR*、*SREBP-2*、*CYP7A*1 和卵泡 *OVR* 的 mRNA 表达量的检测，用荧光定量 PCR 仪（美国 Bio-Rad 公司）测定，配制 20 μL 体系，每个样品 3 个重复。反应体系：0.1%焦碳酸二乙酯（DEPC）水 6 μL、cDNA 模板 2 μL、上下游引物各 1 μL、SYBR Green-II（大连宝生物工程有限公司）10 μL；循环条件：95 ℃预变性 30 s，95 ℃变性 5 s，60 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，40 个循环。目的基因表达量的计算采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法[23]，以 β-actin 表达量为参比。

表 2　目的基因引物序列

Table 2　Primer sequences of the target genes

基因 Genes	序列编号 Sequence No.	产物大小 Product size/bp	引物序列 Primer sequence (5'→3')
β-肌动蛋白 β-actin	NM_205518.1	114	上游：ATTGTCCACCGCAAATGCTTC 下游：AAATAAAGCCATGCCAATCTCGTC
3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 *HMGCR*	NM-204485.1	173	上游：GCTGGAACTATGAGTGCCCAA 下游：TGAGAAGATTGTGAGGAGACCA
固醇结合蛋白元件-2 *SREBP*-2	XM_004937701.1	217	上游：CCAAGGAGAGCCTGTACTGC 下游：CCCATTGAGTCCAGGAAAGA
胆固醇 7α-羟化酶 *CYP7A*1	NM-001001753.1	216	上游：CATTCACTGATACGCCAGGGA 下游：TCTTGACTGCAGCATGACGTA
卵黄蛋白原受体 *OVR*	NM-205229.1	153	上游：TGTGACAGTGGAGAAGATGAAGAG 下游：AGGTGCACACTCCAACTCAT

1.6　数据统计分析

试验数据采用 SPSS 18.0 进行单因素方差分析，组间平均值用 Duncan 氏法进行多重比较，数据均用“平均值±标准差”表示，以 $P<0.05$ 作为差异显著性判断标准。

2　结　果

2.1　苜草素对鸡蛋胆固醇含量的影响

由表 3 可知，在试验第 35 天，600 和 900 mg/kg 苜草素组的蛋黄胆固醇含量显著低于对

照组和 300 mg/kg 苜草素组（*P*<0.05），900 mg/kg 苜草素组的全蛋胆固醇含量显著低于对照组（*P*<0.05），各组的蛋黄重无显著差异（*P*>0.05）。试验第 70 天，900 mg/kg 苜草素组的蛋黄胆固醇含量显著低于对照组（*P*<0.05），各组蛋黄重和全蛋胆固醇含量均无显著差异（*P*>0.05），但试验组组的全蛋胆固醇有降低的趋势，与第 35 天测定结果基本趋于一致。

1 表 3 苜草素对鸡蛋胆固醇含量的影响

Table 3 Effects of polysavone on cholesterol content of eggs

项目 Items	时间 Time/day	苜草素添加水平 Polysavone supplemental level/(mg/kg) 0	300	600	900	1 200	*P* 值 *P*-value
蛋黄胆固醇	35	11.57±0.84^{a}	11.51±0.82^{a}	10.71±0.98^{b}	10.68±0.54^{b}	11.13±0.89^{ab}	0.028
Egg-yolk cholesterol/(mg/g)	70	11.50±0.79^{a}	11.12±0.78^{ab}	10.86±0.64^{ab}	10.52±0.71^{b}	11.07±0.56^{ab}	0.038
蛋黄重	35	15.20±0.77	14.52±0.63	15.29±0.86	14.68±0.53	14.94±0.62	0.051
Yolk weight/g	70	15.69±0.91	15.95±0.74	15.54±0.68	15.89±0.61	16.03±0.65	0.528
全蛋胆固醇	35	175.92±15.09^{a}	166.98±13.47^{ab}	163.37±13.99^{ab}	156.68±8.71^{b}	166.42±16.72^{ab}	0.037
Whole egg cholesterol/（mg/枚)	70	180.36±14.38	177.12±12.24	168.59±9.38	167.06±11.13	177.64±14.53	0.060

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著（*P*<0.05），相同或无字母表示差异不显著（*P*>0.05）。下表同。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference (*P*<0.05), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference (*P*>0.05). The same as below.

2.2 苜草素对蛋鸡血清生化指标的影响

由表 4 可知，饲粮中添加苜草素对蛋鸡血清中 TC、TG、LDL-C 含量无显著影响（*P*>0.05）。饲粮中添加苜草素对蛋鸡血清中 HDL-C 含量有显著影响（*P*<0.05），其中 900 mg/kg 苜草素组与对照组差异显著（*P*<0.05），升高了 37.74%。试验组的高密度脂蛋白（HDL）/低密度脂蛋白（LDL）均高于对照组，其中 600 和 900 mg/kg 苜草素组与对照组差异显著（*P*<0.05），分别升高了 107.50%和 102.50%。

表 4 苜草素对蛋鸡血清生化指标的影响

Table 4 Effects of polysavone on serum biochemical parameters of laying hens mmol/L

项目 Items	苜草素添加水平 Polysavone supplemental level/(mg/kg) 0	300	600	900	1 200	*P* 值 *P*-value
总胆固醇 TC	2.68±0.66	2.57±0.73	2.55±0.72	2.33±0.69	2.34±0.59	0.868
甘油三酯 TG	2.93±0.94	3.04±0.71	3.29±0.87	2.62±0.94	2.32±0.63	0.419
高密度脂蛋白胆固醇 HDL-C	0.53±0.11[b]	0.61±0.08[ab]	0.65±0.09[ab]	0.73±0.14[a]	0.62±0.08[ab]	0.036
低密度脂蛋白胆固醇 LDL-C	1.43±0.47	1.15±0.51	0.89±0.42	0.97±0.41	1.21±0.54	0.343
高密度脂蛋白/低密度脂蛋白 HDL/LDL	0.40±0.15[b]	0.61±0.23[ab]	0.83±0.29[a]	0.81±0.23[a]	0.58±0.19[ab]	0.015

2.3 苜草素对蛋鸡胆固醇代谢相关基因 mRNA 表达量的影响

由表 5 可知，与对照组相比，600、900、1 200 mg/kg 苜草素组肝脏 *HMGCR* mRNA 的表达量分别下降了 64.42%、62.50%、48.08%（$P<0.05$）；与对照组相比，900 和 1 200 mg/kg 苜草素组肝脏 *CYP7A1* mRNA 的表达量分别升高了 61.73%、69.14%（$P<0.05$）。各组肝脏中 *SREBP*-2 和卵巢中 *OVR* mRNA 表达量没有显著差异（$P>0.05$）。

表 5 苜草素对肝脏 *HMGR*、*SREBP*-2、*CYP7A1* 和卵泡 *OVR* mRNA 表达量的影响

Table 5 Effects of polysavone on mRNA expression of *HMGR*, *SREBP*-2, *CYP7A1* in liver and *OVR* in ovarian follicle

项目 Items	苜草素添加水平 Polysavone supplemental level/(mg/kg) 0	300	600	900	1 200	*P* 值 *P*-value
3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 *HMGCR*	1.04±0.32[a]	0.84±0.25[ab]	0.37±0.20[c]	0.39±0.18[c]	0.54±0.30[bc]	＜0.001
固醇结合蛋白元件-2 *SREBP*-2	1.05±0.34	1.28±0.56	1.00±0.33	1.02±0.99	1.31±0.79	0.857
胆固醇 7α-羟化酶 *CYP7A1*	0.81±0.31[a]	0.96±0.34[ab]	1.22±0.28[ab]	1.31±0.20[b]	1.37±0.40[b]	0.035
卵黄蛋白原受体 *OVR*	1.03±0.59	1.02±0.72	1.16±0.46	0.77±0.58	0.94±0.80	0.874

3 讨 论

3.1 苜草素对鸡蛋胆固醇含量和蛋鸡血清生化指标的影响

研究表明，过量摄入高胆固醇食物（如鸡蛋）会危害患有心脏病、高血压、糖尿病等人群的健康[24]，故降低鸡蛋中胆固醇含量对改善蛋品的食用价值具有重要意义。蛋鸡体内胆固醇主要与 LDL 受体结合，以极低密度脂蛋白（VLDL）形式随血液转运至卵母细胞，VLDL 进入卵母细胞的量决定了蛋黄中胆固醇含量[25]。大豆异黄酮中的金雀异黄素（genistein）通

过抑制酪氨酸激酶降低 LDL 受体活性从而降低蛋黄中胆固醇的沉积[26]。尹靖东等[22]用 40 mg/kg 大豆黄酮饲喂 28 周龄蛋鸡，极显著降低了蛋黄和全蛋中胆固醇含量，并显著抑制了氧化胆固醇的形成。Malinow 等[27]发现，苜蓿皂苷通过抑制大鼠肠道对胆固醇的吸收进而降低血清中 TC 含量。有研究称皂苷主要通过与肠道胆固醇结合来促进胆固醇的排泄并降低其吸收，以此调节胆固醇代谢[15]。侯永刚等[28]报道，对蛋鸡饲喂 60 和 90 mg/kg 苜蓿皂苷，蛋黄、全蛋胆固醇含量显著和极显著降低。张丽娜等[20]发现，饲粮中添加苜草素对蛋黄胆固醇含量无显著影响，但 1 000mg/kg 苜草素组能够显著降低全蛋中胆固醇含量且有降低蛋黄胆固醇含量的趋势。本研究结果表明，添加 900 mg/kg 苜草素显著降低了蛋黄胆固醇含量，说明苜草素对鸡蛋胆固醇含量有降低的作用，这可能与苜草素中的黄酮与皂甙等活性物质能够降低鸡蛋胆固醇含量有关，而与张丽娜等[20]的结果有差异是由于本试验选取产蛋高峰期蛋鸡作为试验对象，而前人研究选用产蛋后期蛋鸡，蛋鸡年龄与鸡蛋中胆固醇含量存在显著相关性。但是苜草素的添加水平与其降低鸡蛋胆固醇的含量未呈线性关系，只有添加适当水平苜草素才能发挥其最大效果。

王长康等[19]在肉鸡上的研究结果显示，苜草素试验组显著降低血清中 TC 和雌二醇（E_2）含量，但不影响血清 HDL-C 含量。董晓芳等[29]也有相似报道，在给 1 日龄肉仔鸡饲粮添加 500 mg/kg 苜草素，28 和 42 d 后分别显著降低血清中 TG 和 TC 含量。谢泰华等[30]在 28 周龄蛋鸡中添加苜草素对血脂指标无显著影响，但对血清 TC、LDL-C 含量有降低的趋势。而本试验添加苜草素使蛋鸡血清中 TC 和 LDL-C 含量较对照组有所降低但不显著，与前人研究的结果相似，但本试验添加苜草素组均不同程度升高血清 HDL-C 含量和 HDL/LDL，与前人研究的结果有异，其主要原因：一是苜草素对肉鸡和蛋鸡血脂指标的影响效果不同可能与鸡种有关，肉鸡胆固醇代谢与其生长发育的脂肪代谢有关，而产蛋鸡胆固醇代谢主要是围绕蛋黄胆固醇形成进行，这两者不同的胆固醇代谢模式对鸡来讲，其代谢机制可能不同，且本试验苜草素的添加水平与前人不同也可能是造成结果差异的原因；二是本试验中各组蛋鸡血清 TC 含量未出现显著差异，说明苜草素对蛋鸡循环着的血液总 TC 与蛋黄胆固醇的作用间没有必然相关关系[31]，而苜草素提高 HDL-C 含量和 HDL/LDL，其一说明其更有利于 HDL 将肝外组织中 TC 运回肝脏，在肝脏经代谢转化或以非酯化的形式形成胆汁酸从而排泄掉

[32]，这种功效与胆固醇在机体内的转运有关；其二说明血清中 HDL/LDL 与鸡蛋胆固醇含量存在显著负相关的关系。

3.2 苜草素对蛋鸡胆固醇代谢影响的相关基因调控机制分析。

本研究表明，苜草素影响鸡蛋胆固醇含量，但与其饲粮添加水平不呈线性关系，这种效应的代谢特征主要表现在提高蛋鸡血液 HDL-C 含量和 HDL/LDL。本试验探讨了这种代谢影响的相关基因调控机制。禽类的胆固醇主要在肝脏组织和卵巢组织中合成。研究表明，*HMGCR* 和 *SREBP*-2、*CYP7A*1、*OVR* 分别在蛋鸡胆固醇的合成、排泄、沉积过程中调控着关键作用[33-34]。

蛋鸡从饲料中获取的外源性胆固醇十分有限，主要是通过从头合成途径满足机体胆固醇的需求。HMGCR 是胆固醇合成的限速酶，通过调控 *HMGCR* mRNA 的表达可以控制血清和蛋黄中的胆固醇含量[33]。Elkin 等[34]添加 0.06%的阿托瓦他丁显著降低肝脏细胞 *HMGCR* mRNA 的表达量，并使蛋黄中胆固醇含量下降 35%。本试验表明，添加 600 和 900 mg/kg 苜草素使蛋鸡肝脏 *HMGCR* mRNA 的表达量分别下降了 64.42%、62.50%，而添加 1 200 mg/kg 苜草素组鸡肝脏 *HMGCR* mRNA 的表达量降低了 48.08%，这种效果与其降低蛋黄胆固醇和全蛋胆固醇的试验效果相一致，并能在一定程度上解释苜草素影响鸡蛋胆固醇含量与其饲粮添加水平不呈线性关系之故。说明苜草素可以通过降低 *HMGCR* mRNA 的表达来达到降低鸡蛋胆固醇含量的目的，而对血清中 TC 含量影响不显著是由于血清 TC 含量受到许多因素的影响，它不仅是由胆固醇合成的限速酶基因的表达水平决定的。*SREBP*-2 是转录因子 *SREBPs* 的一种，通过在转录水平上促进 *HMGCR* 的表达来特异性调控胆固醇代谢，但 *SREBP*-2 通常在胆固醇含量较低时才发挥作用[35]。本试验中饲粮添加苜草素未能改变鸡肝脏 *SREBP*-2 mRNA 表达量，说明苜草素没有通过 SREBPs 通路在转录水平来调控 *HMGCR* mRNA 表达。CYP7A1 是动物肝脏中胆汁酸合成的限速酶，Shi 等[36]研究表明：苜蓿皂苷能上调高脂大鼠 *CYP7A*1，增强 CYP7A1 酶活性，从而加强了粪便中胆汁酸的分泌。本试验中添加 900 和 1 200 mg/kg 苜草素蛋鸡 *CYP7A*1 mRNA 表达量显著高于对照组，且饲粮添加 900 mg/kg 苜草素鸡蛋胆固醇降低效果最明显，这与苜草素中含有一定的苜蓿皂苷有关。推测 *CYP7A*1 mRNA 表达量的增加会提高 CYP7A1 酶的活性，加快蛋鸡肝脏胆固醇向胆汁酸的转

化，进而血清中 HDL-C 含量显著增加，限制了胆固醇向鸡蛋蛋黄中的沉积量。说明苜草素增强蛋鸡肝脏胆固醇的排泄也可能是其调控胆固醇代谢的途径之一。蛋黄几乎包含了鸡蛋中全部胆固醇，蛋黄胆固醇的沉积过程主要通过 OVR 介导的内吞作用将 VLDL 携带的胆固醇转运至发育中的卵母细胞，随卵母细胞的生长最终形成蛋黄[37]，OVR 的内吞作用与蛋鸡的繁殖性能至关重要。本试验中饲粮添加苜草素并未影响蛋鸡卵巢中 *OVR* mRNA 的表达量，说明苜草素影响鸡蛋胆固醇含量的调控并未发生在蛋黄胆固醇的沉积环节。综上，苜草素影响鸡蛋胆固醇含量的主要调控途径可能是通过抑制蛋鸡胆固醇的内源性合成和促进胆固醇的排泄来进行。

4 结 论

① 饲粮添加苜草素能降低蛋黄胆固醇和全蛋胆固醇含量，本试验推荐 26~35 周龄蛋鸡饲粮苜草素添加水平为 900 mg/kg。

② 苜草素降低鸡蛋胆固醇含量的代谢特征主要是提高蛋鸡血清 HDL-C 含量和 HDL/LDL，其调控机制主要是通过下调 *HMGCR* mRNA 的表达量来抑制蛋鸡胆固醇的内源性合成和上调 *CYP7A1* mRNA 的表达量来促进胆固醇向胆汁酸的转化排泄 2 种途径来实现。

参考文献：

[1] SPENCE J D,JENKINS D J A,DAVIGNON J.Egg yolk consumption and carotid plaque[J].Atherosclerosis,2012,1-5.

[2] SPENCE J D,JUDD S,HOWARD V,et al.Effect of dietary cholesterol and egg consumption on mortality and cardiovascular risk in the regards study[J].Stroke,2015,46: A83-A83.

[3] ATTIA Y A,AL-HARTHI M A,KORISH M A,et al.Fatty acid and cholesterol profiles and hypocholesterolemic, atherogenic, and thrombogenic indices of table eggs in the retail market[J].Lipids in health and disease,2015,14(1):1.

[4] FERNANDEZ M L.Effects of eggs on plasma lipoproteins in healthy populations[J].Food&function,2010,1(2):156-160.

[5] CHOI Y,CHANG Y,LEE J E,et al.Egg consumption and coronary artery calcification in

asymptomatic men and women[J].Atherosclerosis,2015,241(2):305-312.

[6] Dietary Guidelines Advisory Committee.Scientific report of the 2015 dietary guidelines advisory committee[C].Washington D.C.:USDA and US Department of Health and Human Services,2015.

[7] CHOI Y,CHANG Y,LEE J E,et al.Egg consumption and coronary artery calcification in asymptomatic men and women[J].Atherosclerosis,2015,241(2):305-312.

[8] SHIN J Y,XUN P,NAKAMURA Y,et al.Egg consumption in relation to risk of cardiovascular disease and diabetes:a systematic review and meta-analysis[J].The American journal of clinical nutrition,2013:ajcn-051318.

[9] ZAMPELAS A.Still questioning the association between egg consumption and the risk of cardiovascular diseases[J].Atherosclerosis,2012,224(2):318-319.

[10] GUO J,LOVEGROVE J A,COCKCROFT J R,et al.Egg consumption and cardiovascular disease events-evidence from the Caerphilly prospective cohort study[J].Proceedings of the Nutrition Society,2015,74(OCE5):E291.

[11] SHIN J Y,XUN P,NAKAMURA Y,et al.Egg consumption in relation to risk of cardiovascular disease and diabetes: a systematic review and meta-analysis[J].The American journal of clinical nutrition,2013,98:146-159.

[12] HOUSTON D K,DING J,LEE J S,et al.Dietary fat and cholesterol and risk of cardiovascular disease in older adults: the health ABC study[J].Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases,2011,21(6):430-437.

[13] 石传林,张娜,李有志,等.降低鸡蛋中胆固醇含量的试验研究[J].家禽科学,2015(1):48-50.

[14] 佟建明,萨仁娜,单之玮,等.苜草素对肉仔鸡和仔猪生产性能的影响[J].中国畜牧兽医,2004,31(3):19-21.

[15] 雷祖玉,韩卫涛,冯学勤,等.苜蓿总甙对 AA 肉仔鸡脂类代谢及生产性能的影响[J].中国饲料,2002,18(9):10.

[16] MING M,GUANHUA L,ZHANHAI Y,et al.Effect of the Lycium barbarum polysaccharides administration on blood lipid metabolism and oxidative stress of mice fed high-fat diet *in*

vivo[J].Food Chemistry,2009,113(4):872-877.

[17] ØRGAARD A,JENSEN L.The effects of soy isoflavones on obesity[J]. Experimental Biology AND Medicine,2008,233(9):1066-1080.

[18] DONG X F,GAO W W,SU J L,et al.Effects of dietary polysavone (Alfalfa extract) and chlortetracycline supplementation on antioxidation and meat quality in broiler chickens[J].British Poultry Science,2011,52(3):302-309.

[19] 王长康,刘昊,邵良平.苜草素对蛋鸡生产性能和血液生化指标的影响[J].福建农业学报,2006,3:215-218.

[20] 张丽娜,董晓芳,佟建明,等.苜草素对58-65周龄蛋鸡胆固醇和脂类代谢的影响[J].中国家禽,2010,32(12):27-30.

[21] 张旭,胡艳,蒋桂韬,等.蛋黄中胆固醇含量测定方法的研究[J].饲料博览,2011(12):35-38.

[22] 尹靖东,齐广海,张萍,等.大豆黄酮对鸡蛋胆固醇及其耐氧化性的影响[J].中国农业科学,2004,37(5):756-761.

[23] LIVAK K J,SCHMITTGEN T D.Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J].Methods,2001,25(4):402-408.

[24] SPENCE J D,JENKINS D J A,DAVIGNON J.Egg yolk consumption and carotid plaque[J].Atherosclerosis,2012,224(2):469-473.

[25] 陈冬梅,张克英.鸡蛋胆固醇的沉积机制[J].动物营养学报,2003,15(4):1-6.

[26] SIRTORI C R,LOVATI M R,MANZONI C,et al.Reduction of serum cholesterol by soy proteins: clinical experience and potential molecular mechanisms[J].Nutrition,Metabolism and Cardiovascular Diseases,1998,8:334-340.

[27] MALINOW M R,MCLAUGHLIN P,PAPWORTH L,et al.Effect of alfalfa saponins on intestinal cholesterol absorption in rats.[J].The American journal of clinical nutrition,1977,30(12):2061-2067.

[28] 侯永刚,陈辉,黄仁录,等.日粮添加苜蓿皂苷对蛋鸡生产性能,鸡蛋胆固醇及常规蛋品质的影响[J].中国家禽,2009(8):20-23.

[29] 董晓芳,江勇,高微微,等.苜草素对肉仔鸡免疫,内分泌和脂类代谢的一些指标的影响[J].动物营养学报,2007,19(4):407-410.

[30] 谢泰华.苜草素对蛋鸡生产性能,蛋品质和血脂指标的影响[D].硕士学位论文,福州:福建农林大学,2009.

[31] XU X,HU Y,XIAO W,et al.Effects of fermented Camilla sinensis,Fuzhuan tea,on egg cholesterol and production performance in laying hens[J].Agriculture and Food Science,2012,1:6-10.

[32] WANG J J,PAN T M.Effect of red mold rice supplements on serum and egg yolk cholesterol levels of laying hens[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,2003,51(16):4824-4829.

[33] JUREVICS H,HOSTETTLER J,BARRETT C,et al.Diurnal and dietary-induced changes in cholesterol synthesis correlate with levels of mRNA for HMG-CoA reductase[J].Journal of Lipid Research,2000,41(7):1048-1053.

[34] ELKIN R G,FREED M B,KIEFT,et al.Alteration of egg yolk cholesterol content and plasma lipoprotein profile following administration of a totally synthetic HMG-CoA reductase inhibitor to laying hens[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,1993,41:1094 ~1101.

[35] 柳童斐,宋保亮.胆固醇合成途径的负反馈调控机制[J].中国细胞生物学学报,2013,35(4):401-409.

[36] SHI, Y H,GUO R,WANG X K,et al.The regulation of alfalfa saponin extract on key genes involved in hepatic cholesterol metabolism in hyperlipidemic rats[J].PLoS One,2014,9(2):e88282.

[37] NIMPF J,SCHNEIDER W J.Receptor-mediated lipoprotein transport in laying hens[J].The Journal of Nutrition,1991,121:1471-1474.

Effects and Gene Regulatory Mechanism of Polysavone on Cholesterol Metabolism of Laying Hens

LI Ning LIU xin QU Zhengxiang LIU Tong DU Yu MIN Yuna* GAO Yupeng*

(*College of Animal Science and Technology, Northwest A＆F University, Yangling* 712100, *China*)

Abstract: The experiment was carried out to evaluate the effects of dietary different polysavone supplement level on cholesterol mechanism of laying hens, and discussed its regulation mechanism of gene expression. A total of 540 twenty-six-week-old Nick laying hens were randomly divided into 5 groups with 6 replicates per group and 18 birds per replicate. Laying hens in control group were fed with a basal diet, and other were fed with the basal diets supplemented with 300, 600, 900, 1 200 mg/kg polysavone, respectively. The pre-test lasted for 7 days, and the experiment lasted for 70 days. The results showed as follows: 1） on day 35 and day 70, the yolk cholesterol content in 900 mg/kg polysavone group were significantly lower than that in control group （P<0.05）. 2） Compared with the control group, the high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) content and high density lipoprotein to low density lipoprotein ratio (HDL/LDL) in 900 mg/kg polysavone group significantly increased （P<0.05）. There were no significant difference on the content of total cholesterol (TC), triglyceride （TG） and low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) in serum among all groups （P>0.05）. 3) Compared with the control group, the mRNA expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (*HMGCR*) in liver of laying hens in 600, 900 and 1 200 mg/kg polysavone groups significantly decreased （P<0.05）, and the mRNA expression of cholesterol 7α-hydroxylase (*CYP7A*1) in liver of laying hens in 600 and 900 mg/kg polysavone groups significantly increased （P<0.05）. There were no significant difference on the mRNA expression of sterol regulatory element-binding protein 2 (*SREBP*-2) in liver and occyte vitellogenesis receptor (*OVR*) in serum of laying hens among all groups （P>0.05）. Our present study indicated that dietary supplemented with polysavone can reduce the egg yolk cholesterol. The possible mechanism of cholesterol lowering

effects can result from reducing endogenous synthesis and more cholesterol excretion. The suitable dietary polysavone supplemented level of laying hens aged from 26 to 35 weeks is 900 mg/kg.

Key words: polysavone; feeding; laying hens; cholesterol metabolism; gene expression

*Corresponding authors, MIN Yuna, associate professor, E-mail： 472956784@qq.com; GAO Yupeng professor, E-mail: gaoyupeng112@sina.com (责任编辑　武海龙)